

⑫公開特許公報(A) 平4-108384

⑮Int.Cl.⁵
C 12 N 15/10識別記号 ZNA
府内整理番号
8717-4B⑯公開 平成4年(1992)4月9日
C 12 N 15/00 A

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑰発明の名称 遺伝子クローニング方法

⑲特 願 平2-224626
⑳出 願 平2(1990)8月27日

㉑発明者 阿部 訓也 挨城県つくば市下広岡410-56

㉒出願人 新技術事業団 東京都千代田区永田町2丁目5番2号

㉓代理人 弁理士 西澤 利夫

明細書

1. 発明の名称

遺伝子クローニング方法

2. 特許請求の範囲

(1) 合成リンカーを結合した二本鎖DNA断片を変性させて一本鎖とした後、これらを過剰量の一本鎖プローブDNAと会合させ、プローブDNAとハイブリッドを形成したDNA断片のみを分離し、これらをL-L-P-C-R法により増幅させた後、個々にクローン化することを特徴とする遺伝子クローニング方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、遺伝子のクローニング方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、未知遺伝子、遺伝子ファミリーメンバー、染色体DNA等の迅速なクローニング、あるいは染色体DNAの機能解析など、広く分子生物学的研究分野、さらには特殊ウイルスゲノムの検出などの医

学生物学的応用等に有用な、遺伝子クローニングの高効率化を促すクローニング方法に関するものである。

(従来の技術とその課題)

近年、生命体を構成する組織、機構についての分子生物学的解明と、それにともなう技術的応用が急速に進歩し、遺伝子工学やバイオテクノロジーの基礎が次々に確立されてきている。

このような分子生物学の現在の成功は、希望する遺伝子を選択的に単離する「遺伝子クローニング」という技術によってもたらされたものであると言っても過言ではない。この遺伝子クローニングは、その操作の過程からみると、染色体DNA断片あるいはmRNAを雛型としたcDNAのベクターへの組み込み、宿主細胞内(主として大腸菌)での組換えDNAの増幅、特定のクローンの選択を行うスクリーニングの過程に分けられる。これらの各操作に関わる技術は十分に確立されたものとして多方面で利用されているが、各ステップのさらなる効率化も望まれている。特に最後の

スクリーニング過程は数十万から数百万ものクローンをフィルター上に広げ、目的のクローンをプローブとのハイブリダイゼーションを利用して同定した後、さらに二次、三次のスクリーニングが必要となる場合も多い非常に煩雑な過程である。

さらにまた、従来の遺伝子クローニング方法は、多大な労力と時間、費用を要するばかりでなく、その操作過程において、宿主内でのDNA増幅や、大規模なフィルターハイブリダイゼーションによるスクリーニングのステップを必須とするため、その簡略化、自動化は困難である。またそのため、たとえば多種類のプローブによる反復スクリーニングや、あるいは多くの異なる種類のライブラリーを対象とするスクリーニング等はさらに困難なものとなる。

従って、DNA断片の増幅や選択が簡略化、あるいは自動化されれば、単に従来のクローニング法の省力化としてだけでなく、新しい応用分野を開くことができるものと思われる。

このような観点から、近年、特定の遺伝子

が既知であることが条件となるため、未知遺伝子を対象とすることできず、また、複数のプローブを同時に用いたスクリーニングが困難である等の問題点を有している。

この発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、従来の遺伝子クローニング法とPCR法の長所を合わせ持ち、クローニングの高効率化、微量化、簡便化を達成することのできる新しい遺伝子クローニング方法を提供することを目的としている。

(課題を解決するための手段)

この発明は、上記の課題を解決するものとして、合成リンカーを結合した二本鎖DNA断片を変性させて一本鎖とした後、これらを過剰量の一本鎖プローブDNAと会合させ、プローブDNAとハイブリッドを形成したDNA断片のみを分離し、これらをSLI-PCR法により増幅させた後、個々にクローン化することを特徴とする遺伝子クローニング方法を提供する。

以下、添付した図面の第1図に沿って、この発

DNAをクローニングすることなしに単體増幅することのできるPCR(Polymerase Chain Reaction)法が注目されている。この方法は、ある塩基配列に相補的な一对の合成オリゴヌクレオチドを、*in vitro* DNA合成のプライマーとして用い、アニーリング、伸長、変性のサイクルを繰り返すことにより、鏡型DNA自体に何ら操作を加えることなく、ほぼ均一のDNA断片を多量に得ることを可能にする。さらに、このようにして得た多量の均一なDNA断片を各々ベクターにつなぎ、通常の方法でクローン化することにより、大規模なスクリーニングを行うことなく特定の遺伝子の単離が可能であるため、その増幅過程の自動化にともない、遺伝子クローニングへの適用が最近急速に浸透しつつある。

しかしながら、PCR法により増幅することのできるDNA断片は、プライマーに狭まれた塩基配列に限定されるため、通常のクローニング法の完全な代替とはなり得ない。さらに、PCR法を行なう場合に増幅すべきDNAの両端の塩基配列

明の構成およびその作用、効果について詳しく説明する。

この第1図は、この発明の遺伝子クローニング方法における目的遺伝子の選択および増幅過程を示した模式図である。

まず、クローニングの対象となるDNA断片を含む二本鎖DNAの集団に、合成リンカーを結合する。すなわち、この発明においては、各DNA断片を直接ベクターに挿入連結するかわりに、後述するようなPCR法を用い、*in vitro*でDNAを増幅するが、その際のプライマーとして合成リンカーを結合することにより、通常のPCR法では不可能な未知の配列を含むあらゆるDNA断片を効率よく増やすことができる。この技術は、ローン・リンカーPCR法(SLI-PCR法)と呼ばれるものであり、従来のDNAライブラリーに相当するものが、DNAに合成リンカーを結合させる操作のみで得ることができる。

次に、これらの二本鎖DNAを常法により変性させて一本鎖とし、同様に一本鎖としたプローブ

DNAと溶液中で会合させてハイブリッドを形成させることにより、DNAの集団からクローニングの対象となるDNAを選択する。すなわち、従来の方法において目的とするcDNAのクローンをスクリーニングする場合には、全クローンを対象にフィルターハイブリダイゼーションを行うが、その場合にはクローンをフィルター上に広げる必要があるため、スクリーニングの対象となるクローン数に限界があり、またミスマッチ等の誤りが発生しやすいという問題を有している。そのため、この発明ではプローブとDNAを液相中で会合させ、プローブに相補的なDNAを予め選択した上でクローニングすることを特徴の一つとしている。またこのとき、プローブとその相補的DNAが早く会合するように液相中には過剰量のプローブDNAを添加するようにしている。

次に、このような液相中で形成されたプローブとその相補的DNAとのハイブリッドを1本鎖のままのDNAから分離する。そのための方法として、あらかじめプローブDNAをビオチン標識し

ておき、液相ハイブリダイゼーション後、ビオチンと特異的に結合するストレアトアビシンを塗布した市販の磁気ビーズを液中に混合する。このビーズは磁石を用いて回収できるため、ハイブリッドDNAを他の1本鎖DNAから容易に分離抽出することができる。またビーズ上に吸着したハイブリッドDNAを熱処理し、目的のcDNAをプローブから解離することにより、通常の方法でクローニング可能なDNA断片とすることができます。

ただし、このようにして得た目的DNA断片は非常に微量のため、通常のクローニング法での増幅は困難である。そこで次に、上述のRARGIP法により目的DNAを選択的に増幅し、クローニング可能な量とする。なお、DNAに連結した増幅のための合成リンカーは、その配列中に制限酵素切断部位を含むため、増幅したDNAは常法に従い容易にクローニングすることができる。また必要ならば上記の全工程を繰り返すことにより、さらに目的DNAの選択性を高めることができる。

第1表

以上述べたような方法によれば、必要な遺伝情報を迅速につり上げることができるのでこの方法をRARGIP(Random Access Retrieval of Genetic Information through PCR)法と名付けた。第1表は、このRARGIP法と、通常のクローニング法およびPCR法の、各々の特徴を比較して示したものである。この第1表からも明らかな通り、この発明のRARGIP法は、従来の通常のクローニング法およびPCR法各々の長所を取り入れたものであり、その結果として特に、微量でしかも塩基配列が未知である遺伝子を自動的にクローニングすることができ、さらにそのスクリーニングに際しても複数のプローブの使用が可能であるという利点を有している。

| | 通常のクローニング法 | RARGIP法 | PCR法 |
|-----------|---------------------|-----------------|-----------------|
| 効率 | 低 | 高 | 高 |
| プローブ遺伝情報 | 既知、未知 | 既知、未知 | 配列の全情報必要 |
| 得られる遺伝情報 | プローブ近傍 数kb-数10kb | プローブ近傍 1-2kb | プライマー間の 配列のみ |
| 微量化 | 難 | 易 | 易 |
| 自動化 | 難 | 可 | 易 |
| 複数プローブの使用 | 難 | 可 | 難 |

さらに、このR A R G I P 法を用いた遺伝子クローニングは、その効果の大きさにもかかわらず、実行が非常に簡便である。すなわち、全過程を通じて特殊な技術、材料、装置は一切必要ではなく、ステップ数そのものも少ない。また、液相ハイブリダイゼーションの条件も、日常使用されるサザンあるいはノーザンハイブリダイゼーションと同様であり、今まで蓄積された知見、情報をそのまま活用でき、たとえばプローブも新たに合成する必要はなく、どのようなDNA断片もビオチン標識によりすぐに使用できる汎用性を有している。

そこで、以下に示す実施例においては、精巢RNAを録型としたc DNAからR A R G I P 法により特定の遺伝子を単離した例を示す。もちろんこの発明は以下の例に限定されるものではなく、目的DNAとしては二本鎖DNAであればあらゆるDNA断片を対象とすることができ、また細部の手続き、操作にも様々な態様が可能であることは言うまでもない。

5 μg の L L - S a l I I A (5' - p A T T G A C G T C G A C T A T C C A G G - 3') および L L - S a l I I B (5' - p C C T G G A T A G T C G A C G T C - 3') よりなるローンリンカーを 1000units の T 4 DNA ライゲーズ (宝酒造) 存在下、15時間、16°C の温度で結合させた後、未反応のリンカーをセントリコンー 100 (アミコン社) で除去した。こうして得た c DNA の 1/150 量 (約 0.1 ~ 0.2ng) を、10 mM Tris · C I (pH 8.5) 、50 mM K C I 、2.5 mM M g C I₂ 、10 mM 2-ME 、各々 200 μM の dATP 、dCTP 、dTTP 、dGTP 、およびプライマーとして 1 μg の L L - S a l I I A を含む反応溶液中に混合、総量 50 μl とし、自動化 PCR 装置 (Cetus 社) により増幅を行なった。増幅の条件は、94°C の温度で 45 秒間、53°C で 2 分間、72°C で 4 分間のサイクルを 20 回繰り返した後、生成物の 1/10 (5 μl) を新しい PCR 反応溶液 (成分は上記と同じ) に加えて総量 100 μl とし、さらに同じ条件で 10 回の増幅

実施例 1

(精巢 RNA を録型とした c DNA 合成と、 L L - PCR 法によるその増幅)

まず、 C 57 / B L 6 マウスの精巢より抽出したトータル RNA 10 μg とオリゴ (d T) プライマーアダプター (5' - C T G A T G A T C G A T ... - 3') を 10 pmol / μg 録型 RNA の割合で混合し、70°C の温度で 10 分間加熱した後、氷中に保存した。次に 200units のリバーストランスクリプテース (Superscript, B R L 社) を加え、45°C の温度で 1 時間インキュベートして一本鎖 c DNA を合成した。これに DNA ポリメラーゼ I (24 units) 、 RNase H (20 units) 、 E. Coli DNA ライゲーズ (30 units) を加え、12°C の温度で 2 時間反応させて二本鎖 c DNA とした後、両端を平滑にするため T 4 DNA ポリメラーゼ処理を行なった。

次に、このようにして合成した c DNA を L L - PCR 法により増幅した。

まず、二本鎖 c DNA の両端にそれぞれ

を行なった。その結果、一反応あたり 3 ~ 5 μg の c DNA が得られ、これをアガロースゲル上で電気泳動したところ、 c DNA のサイズの分布としては、~300bp より 2 kb に渡っていることが明らかとなった。

なお、このような c DNA の調製のための出発材料として使用した RNA の量は通常の 1/100 から 1/1000 であり、このことは極微量な材料からのクローニングが十分に可能であることを示唆するものである。

実施例 2

(プローブと c DNA の液相ハイブリダイゼーション)

実施例 1 で調製した増幅 c DNA と、ビオチン標識 DNA プローブとを液相中でハイブリダイゼーションした。

プローブ DNA としては、アクチン c DNA 、 Tctex - 3 遺伝子を含むマウス染色体 DNA 、および Tctex - 7 遺伝子 c DNA を用いた。このうちアクチンは精巢 mRNA 中約 1/100 を占める発

現量の多い遺伝子であり、他の2つはより希な生殖細胞特異的な遺伝子（おそらく全mRNA中の1/10000以下）である。なお、各々のサイズは、0.7Kb、1.25Kb、および0.7Kbである。これらのプローブDNA約500ngを、ビオチン-14-dATPを基質として用いるニックトランスレーション法で標識し、未反応の基質をセントリコン-30で除去した後、100μlの5mM Tris-CI(pH8)、1mM EDTA(pH8)に溶解した。この標識DNAは-20℃の温度で6ヶ月程度は保存可能である。

次に、この標識DNAプローブ全量の1/50に対して、アクチンがプローブの場合はcDNAを10ng、その他のプローブの場合は100ngのcDNAを加え、さらに1Kbに剪断したサケ精巢DNAを20μg添加し全量を10μlとした。次いで、ハイブリダイゼーション用緩衝液を、その最終濃度が50%ホルムアミド、5×SSPE、0.1%SDS、5×Denhardt'sとなるように加え、総量100μlとし、42℃の温度で、アクチンプローブの場合には24時間、他のプローブの場合には15時間インキュベートした。

取り収集できるので、この性質を利用してプローブと未会合のcDNAを除き、次いで500μlの0.2×SSC、0.1%SDS溶液中、65℃の温度で15分間づつ3回洗浄した。最終的に、ビーズを50μlの0.1×SSCに懸濁し、90℃の温度で1分間加熱してcDNAをプローブからはずし、ビーズを取り除いた後のcDNAを含む上清を-20℃の温度で保存した。

実施例4

(L-L-PCR法によるcDNAの増幅と、特定遺伝子の同定、確認)

実施例3で得た上清中に含まれるcDNAをL-L-PCR法で増幅した。上清50μlのうち、5μlを使用し、実施例1と同様の条件で20回PCR反応を繰り返し、その生成物の1/10(5μl)をさらに15回増幅した。この結果得られたDNAをアガロースゲル上で泳動し、DNAの増幅を確認した後、このゲルを用いてサザンプロットを作成した。さらにcDNA分離に使用したプローブを放射能標識し、サザンハイブリダイゼ

ーションの場合は24時間、他のプローブの場合は15時間インキュベートした。

実施例3

(プローブ-cDNAハイブリッドの選択的分離)

実施例2の液相ハイブリダイゼーション中に形成されたcDNAとビオチン標識プローブのハイブリッド分子を選択的に分離するため、ビオチンと特異的に結合するストレプトアビシンを塗布した磁気ビーズ(DYNABEADS M-280、Streptavidin、ダイナル社)を使用した。この方法によれば、プローブの固相化等の煩雑な処理が不要であり、ビーズは液相ハイブリダイゼーション後に添加されるため、DNA分子会合反応への影響も皆無である。

DNAのビーズへの非特異的な吸着を防止するため、100μg/mlのサケ精巢DNAとビーズをあらかじめ1~2時間インキュベートした後、10mg/ml濃度のビーズ20μlを実施例2のプローブ-cDNA溶液100μlに混合し、室温で30分間程やかに振とうした。ビーズは磁石によ

り吸着されるので、この性質を利用してプローブと未会合のcDNAを除き、次いで500μlの0.2×SSC、0.1%SDS溶液中、65℃の温度で15分間づつ3回洗浄した。最終的に、ビーズを50μlの0.1×SSCに懸濁し、90℃の温度で1分間加熱してcDNAをプローブからはずし、ビーズを取り除いた後のcDNAを含む上清を-20℃の温度で保存した。

実施例3で得た上清中に含まれるcDNAをL-L-PCR法で増幅した。上清50μlのうち、5μlを使用し、実施例1と同様の条件で20回PCR反応を繰り返し、その生成物の1/10(5μl)をさらに15回増幅した。この結果得られたDNAをアガロースゲル上で泳動し、DNAの増幅を確認した後、このゲルを用いてサザンプロットを作成した。さらにcDNA分離に使用したプローブを放射能標識し、サザンハイブリダイゼーションを行なった結果、アクチン、Ictex-3、Ictex-7のすべてのプローブに対して相補的なcDNAが増幅されていることが確かめられた。

次に、このcDNAをクローニングするために、ローンリンカー(Sal I A, B)の配列に含まれるSal I制限酵素切断部位を利用して、cDNAをSal Iで消化後、やはりSal Iで切断したプラスミドベクターPT7T318Uに結合させ、その組換えDNAを用いて大腸菌を形質転換した。得られた形質転換菌をフィルター上にまき、一枚当たり300~800のコロニーを形成させた。このフィルターを用いてコロニー-ハイブリダイゼーションを行ない、目的遺伝子cDNAのスクリーニングを行なったところ、第2表に示した通り、アクチンプローブに対してはもちろん、希な遺伝子をプローブとした場合にも多数のポジティブクローニングが得られた。

第 2 表

| プローブ | ポジティブクローン | % |
|-----------|-----------|-----|
| アクチン | 214 / 350 | 61% |
| Tctex - 3 | 66 / 820 | 8% |
| Tctex - 7 | 230 / 610 | 38% |

これに対して、比較例として、従来の方法によるcDNAのクローンを同じく2つのプローブを用いてスクリーニングしたところ、Tctex-7のプローブでは40万のアラーカからわずかに2つのポジティブクローンが得られたにすぎず、Tctex-3のプローブではやはり40万のアラーカをスクリーンしたところポジティブなものはゼロであった。これらの結果および両者の方法に要する労力、費用、時間（たとえば40-50万のアラーカスクリーニングには50枚程度の150μ径フィルターを必要とする）を考え合わせれば、この発明の効率の良さがうかがえる。

なお、上記の通りに得られたポジティブクローンをランダムに選び、そこからプラスミドDNAを調製し、プラスミドに含まれるインサートDNAのサイズを調べたところ、500bpから1000bpまでの様々な大きさのインサートが含まれていることが明らかになった。これらのcDNAがプローブに含まれる遺伝子に由来するものか否かを最終的に確認するために、RARGIP法に

使用したプローブDNAおよびRARGIP法により得たcDNAクローンを各々放射能標識し、マウス染色体DNAに対してサザンハイブリダイゼーションを行なった。もし同一の結果が得られれば、プローブDNA、cDNAとも同一の遺伝子に由来することができる。

その結果は、両者とも同一サイズ、同数のバンドが得られ、このRARGIP法によりプローブに特異的なcDNAクローンが迅速に単離されることが確かめられた。

(発明の効果)

以上詳しく述べた通り、この発明の遺伝子のクローニング方法により、目的とする特定のDNA断片の增幅および選択を簡略化することができるため、遺伝子のクローニングに関わる全操作の高効率化、微量化、および簡便化が可能となる。

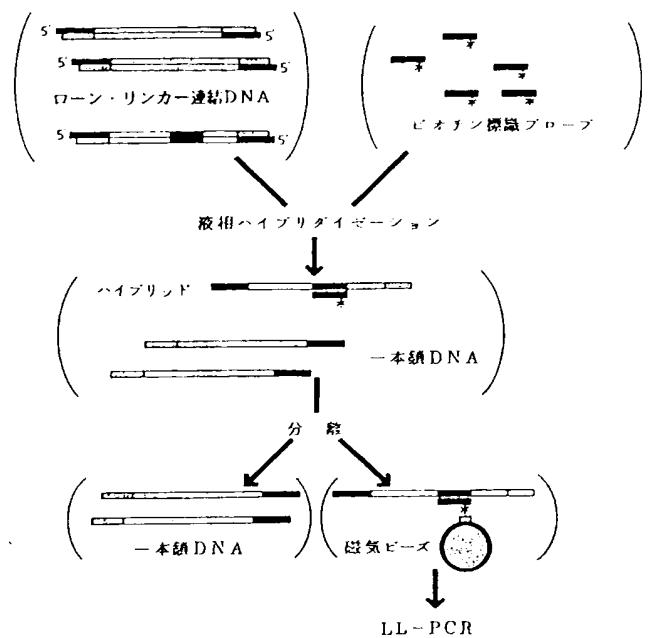
4. 図面の簡単な説明

第1図は、この発明の遺伝子クローニング方法における目的遺伝子の選択および増幅過程を示し

た模式図である。

代理人 弁理士 西澤利夫

第 1 図



PTO 02-3814

Japanese Kokai Patent Application
No. Hei 4[1992]-108384

GENE CLONING METHOD

Kinya Abe

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. JULY 2002
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

JAPANESE PATENT OFFICE (JP)
PATENT JOURNAL (A)
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 4[1992]-108384

| | |
|-------------------------------|--|
| Int. Cl. ⁵ : | C 12 N 15/10 C 12 N 15/00 |
| Sequence Nos. for Office Use: | 8717-4B |
| Filing No.: | Hei 2[1990]-224626 |
| Filing Date: | August 27, 1990 |
| Publication Date: | April 9, 1992 |
| No. of Claims: | 1 (Total 7 pages) |
| Examination Request: | Not filed |

GENE CLONING METHOD

[Idensi Kuroningu Hoho]

| | |
|------------|-----------------------|
| Inventor: | Kinya Abe |
| Applicant: | Shin Gijutsu Jigyodan |

Claim

/1*

A gene cloning method, characterized in that, after modifying a double-stranded DNA fragment bonded with a synthetic linker into a single-stranded, association of the substance with an excessive amount of a single-stranded probe DNA was induced, and only the DNA fragments that form hybrids with the probe DNA are isolated, and after amplifying them by the LL-PCR method, each one of them is cloned.

Detailed explanation of the invention

Industrial application field

This invention pertains to a gene cloning method. More specifically, this invention pertains to a cloning method that can promote gene cloning in a highly efficient way and is

* [Numbers in the right margin indicate pagination in the original foreign text.]

useful for rapidly cloning unknown genes, gene family members and chromosomal DNA, as well as for applications in the broad field of molecular biology including functional analysis of chromosomal DNA, and furthermore, for applications in medical biology such as detection of special virus genomes.

Prior art and the problems

In recent years, there has been rapid progress in molecular biological elucidation with respect to constituting compositions and forming mechanisms of living organisms, as well as in the technical applications that accompany them, and the fundamentals of genetic engineering and biotechnology have gradually been established.

It is not at all an overstatement to say that such success in molecular biology which is seen today is attained through a technique called "gene cloning" which selectively isolates the gene desired. From the standpoint of operating procedure, this gene cloning is separated into a process of recombination of cDNA with a chromosomal DNA fragment or m-RNA as the template into a vector, a process of amplification of the recombinant DNA in a host tissue (mainly *E. coli* bacteria) and a screening process to select a specific clone. The techniques concerning each of these processes have been well established and are widely applied in many areas, but further improvement of the efficiency is still quite desirable for each of the above steps. This is particularly true for the last screening process which is a very complicated process, in which several hundred thousand to several million clones are spread onto a filter, and after identification is carried out utilizing hybridization with a probe, often it is necessary to further carry out the screening a second or third time.

Still further, the conventional gene screening method not only requires a vast amount of labor, time and cost, its simplification and automation are rather difficult because the operating process involves steps of DNA amplification in a host tissue and of screening based on large-scale filter hybridization. For the same reason, screening is even more difficult for the occasions when there are repeat screenings with a multiple number of probes or if a variety of different libraries are the objects.

Therefore, it is considered that, if the amplification or selection of a DNA fragment can be simplified or automated, not only there will be a savings on the labor in the conventional cloning method, it could also open new application fields.

From this standpoint, a polymerase chain reaction (PCR) method capable of isolating and amplifying a specific gene DNA without cloning has been the focus point in recent years. In this method, an almost homogeneous DNA fragment can be obtained in large quantity by repeating a cycle of annealing, lengthening and modification using a pair of synthetic oligonucleotides complementary to a given base sequence as the primer for in vitro DNA synthesis, without

carrying out any operation on the template DNA itself. Additionally, each of the almost homogeneous DNA fragments is linked to a respective vector, and by cloning with normal methods, a specific gene can be isolated without going through a large-scale screening process. Accompanying automation of the amplification process, this method has been rapidly adapted in gene cloning in recent years.

However, since the DNA fragment to be amplified by PCR method is limited to the base sequence positioned between the primers, the method could not be a complete substitute for a normal cloning method. Also, when carrying out amplification by PCR method, it is necessary that the two terminal base sequences are known for the DNA to be amplified. Therefore, unknown genes cannot be used as the objects. Additionally, there is the problem that screening with a multiple number of probes has proven to be a difficult process.

The present invention is achieved by focusing on the aforementioned aspects and the objective lies in providing a novel gene cloning method capable of carrying out cloning in a micro quantity at high efficiency and in a simplified way, by combining the advantage of the conventional gene cloning method and that of the PCR method.

Means to solve the problem

The present invention aims to solve the aforementioned problem and provides a gene cloning method characterized in that, after modifying a double-stranded DNA fragment bonded with a synthetic linker into a single-stranded, association of the substance with an excessive amount of a single-stranded probe DNA was induced, and only the DNA fragments that form hybrids with the probe DNA are isolated, and after amplifying them by the LL-PCR method, each one of them is cloned.

The constitution, operation and effect of the present invention are explained in detail in the following using the accompanying figure, Figure 1.

Figure 1 is a model diagram depicting the selecting and amplifying processes for the objective gene of the gene cloning method of the present invention.

First, a group of double-stranded DNAs containing the objective DNA fragment for cloning is bonded to a synthetic linker. In other words, in the present invention, instead of directly inserting each DNA fragment into a vector, *in vitro* DNA amplification is carried out with a PCR method to be described below, during which a synthetic linker is bonded as a primer and various DNA fragments containing unknown base sequences can be increased at high efficiency, which has been unattainable by the conventional PCR method. This technique is called lone linker PCR method (LL-PCR method) and corresponds to the conventional DNA library, yet it can simply be attained with a process of bonding a synthetic linker to the DNA.

Next, these double-stranded DNAs are modified by the conventional method to give single-stranded DNAs, for which association is induced in a solution with probe DNA that is modified to single-stranded in the same manner, to form hybrids, and the DNA as the object for cloning is selected from the group of DNAs. In other words, in the case of the conventional method for screening clones for an objective cDNA, filter hybridization is carried out for all the clones. In doing so, it is necessary to spread the clones onto a filter, but the drawback is that there is a limitation to the number of clones which can be spread, while there is also the problem that mistakes such as a mismatch can easily occur. Therefore, one characteristic of the present invention is that the probe and the DNA are associated in a solution, and by which the DNA complementary to the probe is screened and selected, which is then cloned. Also, during the process, in order to accelerate the association of the probe and the complementary DNA, an excessive quantity of the probe DNA is added in the solution.

Next, the hybrids formed in the liquid phase from the probe and the complementary DNA are separated from the DNAs that remain single-stranded. As a method for such operation, the probe DNA is prelabeled with biotin, and commercial magnetic beads coated with streptavidin which specifically bind biotin are mixed in the solution after the liquid phase hybridization is completed. These beads are easily recovered with a magnet and the hybrid DNA can be easily extracted and isolated from the remaining single-stranded DNAs. Also, the hybrid DNA adsorbed on the beads is heat-treated, and the objective cDNA is separated from the probe to afford a DNA fragment that can be cloned by normal methods.

However, the objective DNA obtained in such manner in general is in an extremely minute quantity, and amplification by normal cloning methods is difficult. Therefore, in the next step, the objective DNA is selectively amplified by the aforementioned LL-PCR method to afford a quantity that is capable of being cloned. Here, because the synthetic linker that is bonded to the DNA for amplification contains in its sequence a site for restrictive enzyme splicing, the amplified DNA can be easily cloned by following conventional methods. Also, if necessary, the entire aforementioned procedure can be repeated to increase the selectivity of the objective DNA.

According to the method described above, necessary information can be retrieved in a speedy way, and the method is called the RARGIP (Random Access Retrieval of Genetic Information through PCR) method. Table 1 shows the respective characteristics of the RARGIP method, conventional cloning method and PCR method. It is clear from Table 1 that the RARGIP method of the present invention encompasses all the advantages of the conventional cloning method and the PCR method. As a result, there are special advantages that a micro quantity of gene having an unknown base sequence can automatically be cloned and that, in addition, a multiple number of probes can be utilized during the screening.

Table 1

| | 通常のクローニング法 | RARGIPM | PCR法 |
|----|------------|---------|------|
| 1 | ● | ● | ● |
| 2 | ● | ● | ● |
| 3 | ● | ● | ● |
| 4 | ● | ● | ● |
| 5 | ● | ● | ● |
| 6 | ● | ● | ● |
| 7 | ● | ● | ● |
| 8 | ● | ● | ● |
| 9 | ● | ● | ● |
| 10 | ● | ● | ● |
| 11 | ● | ● | ● |
| 12 | ● | ● | ● |
| 13 | ● | ● | ● |
| 14 | ● | ● | ● |
| 15 | ● | ● | ● |
| 16 | ● | ● | ● |
| 17 | ● | ● | ● |
| 18 | ● | ● | ● |

- Key:
- 1 Normal cloning method
 - 2 method
 - 3 Efficiency
 - 4 Low
 - 5 High
 - 6 Probe genetic information
 - 7 Known, unknown
 - 8 Requires entire information on the sequence
 - 9 Obtained genetic information
 - 10 Few kb to a few dozen kb around the probe
 - 11 1-2 kb around the probe
 - 12 Sequence in between primers only
 - 13 At micro quantity
 - 14 Difficult
 - 15 Easy
 - 16 Automation
 - 17 Possible
 - 18 Utilizing a multiple number of probes

Furthermore, the operation of gene cloning by this RARGIP method is extremely simple despite the fact that the efficiency is high. In other words, no special technique, material or equipment is required throughout the entire procedure. Also, the condition for the liquid phase hybridization is the same as that for the Southern hybridization or Northern hybridization which is normally applied, and the know-how and information accumulated until now can all be

utilized. For example, there is no need to synthesize anew the probe and any DNA can have broad applications and can readily be utilized through biotin labeling.

Here, the application examples shown below are examples of isolating a specific gene from cDNA with testis RNA as the template using the RARGIP method. Needless to say, the examples below are not to be construed as limiting the present invention, and various DNA fragments can be utilized as the objective DNA as long as they are double-stranded DNAs and the detailed procedure and operation can be conducted in many different forms.

Application Example 1

Synthesis of cDNA with testis RNA as template and amplification with LL-PCR method

First, total RNA 10 µg extracted from the testis of a C57/BL6 mouse was mixed with an oligo (dT) primer adapter (5'-CTGATGATCGAT₁₄-3') at a ratio of 10 pmol/µg template RNA. After heating for 10 min at 70°C, the mixture was kept on ice. Next, 200 units reverse transcriptase (Superscript, product of BRL Company) were added and single-stranded cDNA was synthesized by incubating for 1 h at 45°C, followed by adding DNA polymerase I (24 units), RNase H (20 units) and *E. coli* DNA ligase (30 units) for reacting at 12°C for 2 h to synthesize double-stranded cDNA. Subsequently, T4 DNA polymerase treatment was carried out to smooth out the two terminals.

Next, the cDNA synthesized in such manner was subjected to amplification by the LL-PCR method.

First, after a lone linker formed from 5 µg LL-SalIA (5'-pATTGACGTCGACTATCCAGG-3') and LL-SalIB (5'-pCCTGGATAGTCGACGTC-3') was used to bind the two terminals of the double-stranded cDNA, respectively, in the presence of 1000 units T4DNA ligase (product of Takara Shuzo) for 15 h at 16°C, the unreacted linker was removed by a Centricon-100 (product of Amicon Company). The cDNA so obtained was then mixed at a 1/150 ratio (about 0.1-0.2 ng) into a reaction solution containing 10mM Tris-Cl (pH 8.5), 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 10mM 2-ME, 200 µM each of dATP, dCTP, dTTP and dGTP, and 1µg LL-SalIA as the primer, to a total volume of 50 µL, and amplification was carried out using an automated PCR device (product of Cetus Company). The amplifying conditions comprised repeating 20 times a cycle of 45 s at 94°C, 2 min at 53°C and 4 min at 72°C, followed by adding 1/10 (5 µl) of the product to the PCR reaction solution (same as the above composition) to make a total volume of 100 µL, and amplification was further repeated 10 times under the same conditions. As a result, 3-5 µg cDNA were obtained in one reaction, and when this was subjected to agarose gel electrophoresis, it was found that the size distribution of the cDNA was from 300 bp to 2 kb.

In this operation, the quantity of the RNA utilized as the starting material for preparing such cDNA is in general from 1/100 to 1/1000, suggesting that it is possible to carry out cloning with an extremely minute quantity of material.

Application Example 2

Liquid-phase hybridization of probe and cDNA

The amplified cDNA prepared in Application Example 1 was hybridized with biotin-labeled DNA probe in liquid phase.

Actin cDNA, mouse chromosomal DNA containing Tctex-3 gene and Tctex-7 gene cDNA were used as the probe DNAs. Among them, actin is a gene which can have a large quantity of expression and comprises about 1/100 in quantity in testis mRNA, and is a rare productive cell-specific gene (probably less than 1/10,000 in the entire mRNA) compared to the other two. Also, the sizes were 0.7 kb, 1.25kb and 0.7 kb, respectively. About 500 ng of these probe DNAs were labeled by the nick translation method using biotin-14-dATP as the substrate. After the unreacted substrate was removed with Centricon-30, it was dissolved in 100 µl 5mM TrisCl (pH 8) and 1mM EDTA (pH 8). This labeled DNA can be stored at -20°C for 6 months.

/5

Next, to 1/50 of the total quantity of the labeled DNA probes, 10 ng cDNA in the case of actin as the probe or 100 ng cDNA in the case of other probes were added, and 20 µg salmon testis DNA spliced to 1 kb were added and the total quantity was made to 10 µL. Next, a buffer solution for hybridization was added to give a final concentration of 50% formamide, 5 x SSPE, 0.1% SDS and 5 x Denhardt's, and the total quantity was made to 100 µL. This was followed by incubating at 42°C for 24 h in the case of the actin probe and for 15 h in the case of other probes.

Application Example 3

Selective isolation of probe cDNA hybrid

Magnetic beads coated with streptavidin (DYNABEADS, Streptavidin, product of Dynar [transliteration] Company) which bind specifically to biotin were used to selectively isolate the hybrid molecules of cDNA and biotin-labeled probe formed in the liquid hybridization in Application Example 2. According to this method, there is no need for a tedious treatment such as solidification of the probes, and because the beads are added after the liquid-phase hybridization, there is no effect on the association of the DNA molecules.

To prevent the non-specific adsorption of DNA onto the beads, 100 µg/mL salmon testis DNA and the beads were preincubated for 1-2 h, and then 20 µL beads at 10 mg/mL concentration were mixed with 100 µL probe cDNA solution from Application Example 2, which was shaken for 30 min at room temperature. Since the beads could be collected with a magnet, the cDNAs not associated with the probes were removed by applying this property.

Next, 500 µL solution of 0.2 x SSC and 0.1% SDS were used for washing the beads 3 times at 65°C for 15 min. Finally, the beads were suspended in 50 µl 0.1 x SSC, followed by heating at 90°C for 1 min to detach cDNA from the probes, and the supernatant containing the cDNA after removing the beads was stored at -20°C.

Application Example 4

Amplification of cDNA by LL-PCR method, and identification and verification of specific genes

The cDNAs contained in the supernatant obtained in Application Example 3 were amplified by LL-PCR method. PCR was repeated 20 times under the same conditions as in Application Example 1, using 5 µL of the 50 µL supernatant, and 1/10 (5 µL) of the product was further amplified 15 times. The resulting DNA was subjected to agarose gel electrophoresis and after the amplification of the DNA was verified, a Southern blot was prepared using this gel. Furthermore, after the radioactivity of the probe utilized in cDNA separation was verified, Southern hybridization was carried out. As a result, it was confirmed that the cDNA complementary to all actin, Tctex-3 and Tctex-7 probes was amplified.

Next, to clone this cDNA, the cDNA was digested with SalI using the splicing site of SalI restrictive enzyme contained in the sequence of the lone linker (SalI A,B), followed by bonding to plasmid vector p-T7T318U which was also spliced by SalI, and the recombinant DNA was used to transform *E. coli* bacteria. The obtained transformed bacteria were spread onto filters to form 300-800 colonies per filter. Colony hybridization was carried out using this filter, and screening of the objective gene cDNA was conducted. As a result, as shown in Table 2, a large quantity of positive clones was obtained not only from actin probe but also from probes using rare genes.

Table 2

| アローブ① | ポジティブクローナー② | × |
|-----------|-------------|-----|
| アクチニン③ | 214 / 350 | 61% |
| Tctex - 3 | 66 / 820 | 8% |
| Tctex - 7 | 230 / 610 | 38% |

- Key:
- 1 Probe
 - 2 Positive clone
 - 3 Actin

On the other hand, as a comparative example, screening was conducted by the conventional method using cDNA clone and the same two probes. For the Tctex-7 probe, only two positive clones were obtained out of 400 thousand plaques. For the Tctex-3 probe, there was 0 positive clones out of the same 400 thousand plaques. From these results and considering the labor, cost and time required by the two methods (for example, to screen 400-500 thousand plaques, it requires about 50 filters of 150 mm in size), it is clear that the efficiency of the present invention is superior.

Also, the positive clones obtained in the aforementioned manner were randomly selected and plasmid DNA was prepared from them. When the size of the insert DNA contained in the plasmid was examined, it was found that it contained various sizes of inserts from 500 bp to 1000 bp. To conduct a final verification to see if these cDNAs were from genes contained in the probes, the probe DNAs utilized in the RARGIP method and the cDNA clones obtained by the RARGIP method were each labeled with radioactivity, and Southern hybridization with mouse chromosomal DNA was carried out. If the same result is obtained, the probe DNA and the cDNA are from the same gene.

The result showed that the same size and same number of bands were obtained for the two, confirming that cDNA clone specific to the probe can be rapidly isolated by the RARGIP method.

Effect of the invention

As described in detail above, according to the gene cloning method of the present invention, the entire operation of gene cloning can be carried out in a micro quantity at high efficiency and in a simplified way because it is able to simplify the amplification and selection of objective, specific DNA fragments.

Brief description of the figure

Figure 1 is a model diagram depicting the selecting and amplifying processes for the objective gene of the gene cloning method of the present invention.

/7

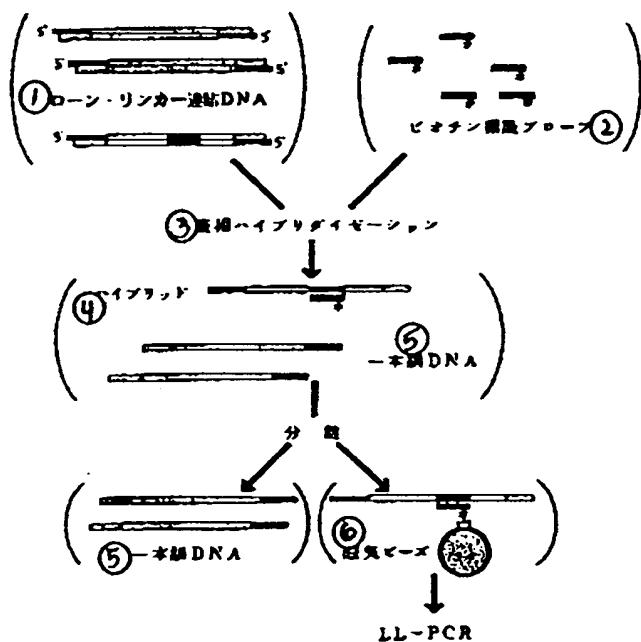


Figure 1

- Key:
- 1 DNA bonded with lone linker
 - 2 Probe labeled with biotin
 - 3 Liquid-phase hybridization
 - 4 Hybrid
 - 5 Single-stranded
 - 6 Magnetic beads